

09/889321

PCT/JPGO/06379

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

19.09.00

JP00/6379.

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年11月15日

REC'D 06 NOV 2000

WIPO

PCT

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第324771号

出願人

Applicant(s):

科学技術振興事業団

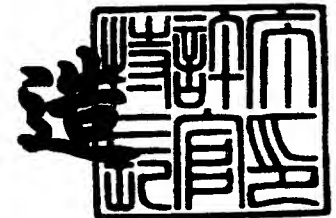
EU

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3085434

【書類名】 特許願

【整理番号】 K010P02

【提出日】 平成11年11月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A01N 1/00
C12N 5/00

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県徳島市国府町井戸字北屋敷 4 5 - 1

【氏名】 高浜 洋介

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 後天的免疫寛容の獲得方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 幼若 T リンパ球を介して胸腺へ外来性 DNA を導入することを特徴とする外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項 2】 外来性 DNA が導入された幼若 T リンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性 DNA を発現させることを特徴とする請求項 1 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項 3】 外来性 DNA が、少なくともアレルギー性疾患惹起物質又は自己免疫性疾患惹起物質をコードする遺伝子を含む DNA であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項 4】 外来性 DNA が、少なくともペプチド性治療薬をコードする遺伝子を含む DNA であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項 5】 外来性 DNA が、少なくともベクターを含む DNA であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項 6】 ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 5 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項 7】 ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項 6 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法。

【請求項 8】 遺伝子治療における外来性 DNA を幼若 T リンパ球を介して胸腺へ導入することを特徴とする遺伝子治療効果の持続方法。

【請求項 9】 遺伝子治療における外来性 DNA が導入された幼若 T リンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で外来性 DNA を発現させることにより、外来

性DNA及び／又はその発現産物により惹起される免疫応答を回避することを特徴とする請求項 8 記載の遺伝子治療効果の持続方法。

【請求項 1 0】 外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項 8 又は 9 のいずれか記載の遺伝子治療効果の持続方法。

【請求項 1 1】 ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 0 記載の遺伝子治療効果の持続方法。

【請求項 1 2】 ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項 1 1 記載の遺伝子治療効果の持続方法。

【請求項 1 3】 幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とする外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項 1 4】 外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させることを特徴とする請求項 1 3 記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項 1 5】 外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項 1 6】 ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 1 5 記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項 1 7】 ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項 1 6 記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項 1 8】 非ヒト動物が齧歯類に属する非ヒト動物であることを特徴とする請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれか記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【請求項 19】 齧歯類に属する非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 18 記載の外來性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、幼若 T リンパ球を介する胸腺への DNA 導入による、ウイルスベクター由来成分等の外來性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法や、遺伝子治療における外來性 DNA 及び／又はその発現産物に対する拒絶応答を回避する遺伝子治療効果の持続方法や、ウイルスベクター由来成分等の外來性 DNA 及び／又はその発現産物に対して後天的免疫寛容を獲得したマウス等の非ヒト動物に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体は一般に自己を構成する抗原に対しては免疫応答を示さない。これは自然な免疫寛容と呼ばれている。一方、本来異種の抗原であっても投与の時期（特に胎生期ないし新生期）、投与の方法（たとえば免疫抑制剤を用いるとか）、投与するときの性状（タンパク質抗原なら変性物を除いて投与する）によっては、その後の免疫応答に対して反応性を示さない状態を誘導できる。これは、後天的ないし獲得寛容と呼ばれている。また、免疫応答とは、一般に自己と自己以外のもの（非自己）とを識別し、非自己に対して細胞性や体液性の反応を起こしたものと捉えられている。この識別は、リンパ球表面にある抗原受容体によって行われ、非自己と認識した場合には、リンパ球が増殖して細胞傷害性を発揮したり抗体を産生するようになる。しかし、リンパ球による認識の最初の段階では、まず、樹状細胞やマクロファージが異物（非自己）を取込み、T リンパ球によって認識されうる形で提示するという段階が必要なので、自己と非自己の認識は樹状細胞やマクロファージと T リンパ球との相互作用のレベルで行われているとも考えられている。

【0003】

一方、組換えDNA等の実験により得られた外来遺伝子を患者の体細胞に導入して、その遺伝子の機能により該患者の遺伝子疾患を治療する遺伝子治療は、癌、免疫不全、心血管疾患等の多くの遺伝子疾患に適用されつつある。しかし、遺伝子治療を阻んでいる最も大きな原因は、遺伝子を導入する際に用いるベクター（遺伝子導入のための運び屋）成分に対する上記免疫応答である。すなわち、細胞に遺伝子を導入することそのものは技術的に完成しつつあるが、遺伝子導入の為には必ず何らかのベクターを用いなければならない。また、このベクターの遺伝子導入方法としては、レトロウイルス・アデノウイルス・レンチウイルス等いろいろなウイルス系を用いるウイルスベクター法や、DNAを包み込んだ膜を細胞と融合させるリボソーム法や、直接遺伝子を導入するマイクロインジェクション法や、挿入DNAのサイズが制限されずかつ細胞親和性が高いというセンダイウイルス（HVJ）法（J. Biol. Chem. 264, 12126-12129, 1989、J. Biol. Chem. 266, 3361-3364, 1991、Biochem. Biophys. Res. Commun. 186, 129-134, 1992、Circ. Res. 73, 898-905, 1993、Science 243, 375-378, 1989、J. Clin. Invest 94, 978-984, 1994）等が知られている。

【0004】

上記のいずれの遺伝子導入方法においても、導入するベクターは我々の身体にとっては異物であるために、これらベクターの成分に対する免疫応答が惹き起こされ、その結果、早晩のうちに（通常2週間から1ヶ月のうちに）生体はベクターを排除してしまう。例えばウイルスベクターの場合、ベクター成分が感染細胞内でタンパク質として発現し、そのタンパク質が細胞表面にペプチドとして発現され、Tリンパ球がベクター由来のペプチドを認識して感染細胞を殺し、ベクター（ウイルス）を排除してしまう。このように、現在の遺伝子治療においては、遺伝子導入そのものには成功しても、長期の持続性効果を得ることには再現よく成功していない欠点があった。

【0005】

また従来、後天的免疫寛容の獲得方法に関して、脂溶性成分又は脂溶性成分含有物質を抗原と同時に摂取させないことにより哺乳動物に対して免疫寛容を誘導する方法（特開平9-194393号公報）や、経口投与によって実質的に薬

理効果を奏さず、注射によって薬理的効果を奏し、かつ注射による繰り返し投与によって薬理効果が発揮されなくなる薬物を有効成分とする医薬製剤であって、経口免疫寛容を誘導するのに十分な投与単位数の該薬物含有経口投与用製剤と、経口免疫寛容が誘導された後に投与するための該薬物含有注射用製剤とからなる医薬製剤を用いる方法（特開平10-298101号公報）や、移植受け入れ患者に対応した特異的な免疫寛容を得た動物から臓器を摘出することにより、移植された臓器のリンパ球などで構成される末梢性免疫機構が、移植された後ヒトの組織適合抗原を攻撃せず、良好な臓器生着を有する人工臓器を用いて移植患者に免疫寛容を成立させる方法（特開平9-187470号公報）が知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

F T O C（幼若胸腺組織培養）においてレトロウイルスを介して遺伝子を直接導入する方法やTリンパ球発達におけるMAPキナーゼの役割に関する情報が報告（Cell 86, 243-251, 1996）されており、従来も胸腺に遺伝子を導入しようとする試みがあったが、正常の実験動物においても大変効率が悪く、既存のTリンパ球による排除作用を抑える効果に乏しく、そのため実用性に乏しかった（FASEB. J. 6, 2853-2858, 1992、Ann. Surg. 222, 229-242, 1995、J. Clin. Invest. 98, 2640-2647, 1996）。

【0007】

本発明者らは、遺伝子治療を受けさせる個体のモデル動物として、マウスを用いて、グリーン蛍光蛋白質（GFP）遺伝子とレトロウイルスベクター（pGD）とを結合させたpGD-GFPを皮内や腹腔内に注入したところ、かかるマウスがベクター成分に対して免疫応答を示し、GFP遺伝子が組み込まれたウイルスベクターを2週間から1ヶ月のうちに体内から消失していたが、Tリンパ球を欠損した免疫不全マウスを用いて同様に実験を行ったところ、かかる免疫応答が起こらなかった。この原因はTリンパ球を介した細胞性免疫応答、すなわちTリンパ球が遺伝子疾患の治療に有用なベクター遺伝子やその発現産物を非自己として認識し排除しているものと考えられた。

【0008】

本発明の課題は、上記のように遺伝子治療用等の有用な外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物を「非自己」ではなく「自己」として認識させることができる、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する拒絶応答を回避することができる遺伝子治療効果の持続方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、生体のTリンパ球が遺伝子導入用ウイルスベクターの成分を「非自己」ではなく「自己」として認識するように、生体のTリンパ球系を再教育し、かかる導入遺伝子ベクターに対する免疫応答を回避させる方法を鋭意研究した結果、本発明者らの胸腺での幼若Tリンパ球への遺伝子導入テクニック(J. Immunol. 161, 2888-2894, 1998、Immunity 9, 565-574, 1998)を用いてマウス幼若Tリンパ球にpGD-GFP遺伝子を導入し、かかる遺伝子導入細胞をGFPの発現による蛍光染色を利用して精製し、正常のマウスのTリンパ球を一過性に抑制するため低線量の放射線を照射し、遺伝子導入幼若Tリンパ球を胸腺に移入し、このマウスの放射線照射からの回復を持ってから、pGD-GFPレトロウイルスを皮内や腹腔内に注射したところ、幼若Tリンパ球前処理の効果で、マウス内で導入遺伝子GFPの発現は長期間にわたり持続していた。すなわち、抗ベクター免疫応答を回避させることができ、持続的な遺伝子治療が可能になることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

またこのとき、ベクター成分以外の外来分子に対する免疫応答は正常に保たれており、マウスの免疫系全体が傷害を受けたわけではなく、遺伝子治療用のベクターに対しての特異的免疫寛容が誘導されたことや、他の臓器で遺伝子導入に用いるベクターをそのまま幼若Tリンパ球に発現させることは問題なく可能であることがわかった。この方法を用いることによって、自己・非自己の識別をもたら

す中心機関である胸腺に、幼若Tリンパ球を介して効率よく遺伝子を導入することができ、胸腺気管内でのベクター成分の効率のよい発現と、それによる効率のよいTリンパ球の自己寛容の成立がもたらされることがわかった。

【0011】

すなわち本発明は、幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とする外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項1）や、外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させることを特徴とする請求項1記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項2）や、外来性DNAが、少なくともアレルギー性疾患惹起物質又は自己免疫性疾患惹起物質をコードする遺伝子を含むDNAであることを特徴とする請求項1又は2記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項3）や、外来性DNAが、少なくともペプチド性治療薬をコードする遺伝子を含むDNAであることを特徴とする請求項1又は2記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項4）や、外来性DNAが、少なくともベクターを含むDNAであることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項5）や、ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項5記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項6）や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項6記載の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法（請求項7）に関する。

【0012】

また本発明は、遺伝子治療における外来性DNAを幼若Tリンパ球を介して胸腺へ導入することを特徴とする遺伝子治療効果の持続方法（請求項8）や、遺伝子治療における外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で外来性DNAを発現させることにより、外来性DNA及び／又はその発現産物により惹起される免疫応答を回避することを特徴とする請求項8記載の

遺伝子治療効果の持続方法（請求項 9）や、外来性 DNA が、少なくともベクターを含む DNA であることを特徴とする請求項 8 又は 9 のいずれか記載の遺伝子治療効果の持続方法（請求項 10）や、ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 10 記載の遺伝子治療効果の持続方法（請求項 11）や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項 11 記載の遺伝子治療効果の持続方法（請求項 12）に関する。

【0013】

さらに本発明は、幼若 T リンパ球を介して胸腺へ外来性 DNA を導入することを特徴とする外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 13）や、外来性 DNA が導入された幼若 T リンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性 DNA を発現させることを特徴とする請求項 13 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 14）や、外来性 DNA が、少なくともベクターを含む DNA であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 15）や、ベクターが外来遺伝子導入用ウイルスベクターであることを特徴とする請求項 15 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 16）や、ウイルスベクターが、レトロウイルス、アデノウイルス又はレンチウイルスに由来するベクターであることを特徴とする請求項 16 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 17）や、非ヒト動物が齧歯類に属する非ヒト動物であることを特徴とする請求項 13～17 のいずれか記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 18）や、齧歯類に属する非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 18 記載の外来性 DNA 及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物（請求項 19）に関する。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明の外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法は、幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とし、詳しくは、外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させることを特徴とする。

【0015】

本発明において外来性DNAとは、後天的免疫寛容を獲得しようとする動物に元来存在しないDNAをいい、その翻訳産物が該動物にとって非自己として認識されるDNAをいう。また、本発明において外来遺伝子とは、後天的免疫寛容を獲得しようとする動物に元来存在しない遺伝子をいい、その翻訳産物が該動物にとって非自己として認識される遺伝子をいう。そして、前記外来性DNAとしては、外来遺伝子やベクターや目的遺伝子が組み込まれたベクター等を具体的に挙げることができ、外来遺伝子としては、例えば、少なくともアレルギー性疾患惹起物質や自己免疫性疾患惹起物質、特に深刻なアレルギー性疾患惹起物質や慢性関節リウマチの疾患惹起物質であるMBP（ミエリン塩基性タンパク質）分子等の自己免疫性疾患惹起物質をコードする遺伝子等や、少なくともペプチド性抗癌剤やペプチド性糖尿病治療薬等をコードする遺伝子等を挙げる事ができ、また、ベクターとしては、前記外来遺伝子の導入用等のウイルスベクター、プラスミドベクター、ファージベクター、酵母人工染色体（YAC）ベクター等のベクターを例示することができるが、ウイルス粒子として感染させた場合に形質転換効率が非常に高い点でウイルスベクター、特にレトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス等に由来するウイルスベクターを用いることが好ましい。これらウイルスベクターを用いる場合、該ウイルスベクターを予め宿主細胞に感染させ、ウイルスプロデューサー細胞として用いることが好ましい。

【0016】

本発明において用いられる幼若Tリンパ球とは、抗原受容体及び機能的コレセプターCD4／CD8などを発現する成熟Tリンパ球になる前のTリンパ球をいい、例えば、成体胸腺リンパ球から分画・精製することにより、また胎生14～18日頃の胸腺葉から得ることができる。胎生14～15日頃の胸腺葉は、左右両葉が個別に心臓上方に存在し、透明感のある球体で周辺組織とは区別しやすく

成熟Tリンパ球の混入がない点で、この時期の胸腺葉を用いることが好ましい。

【0017】

本発明における外来性DNAを幼若Tリンパ球へ導入する方法としては、本発明者らが開発した遺伝子導入テクニック (J. Immunol. 161, 2888-2894, 1998, Immunity 9, 565-574, 1998)、例えば、幼若Tリンパ球とウイルスプロデューサー細胞を共培養し、ウイルスプロデューサー細胞よりも大きさが小さく、密集度が低いことを利用して、遺伝子が導入された幼若Tリンパ球をフォワード&サイドスキャッター (forward and side scatter) により分離し、蛍光活性化セルソーターにより、生存能力のある幼若Tリンパ球を分離・精製する方法や、造血細胞マーカーCD45に対する抗体を染色したものを使用して、フローサイトメトリーセルソーターでGFP⁺CD45⁺細胞をソートすることにより遺伝子が導入された幼若Tリンパ球を、繊維芽細胞由来のウイルスプロデューサー細胞から識別して分離・精製する方法を用いることが、Tリンパ球の教育器官である胸腺器官内で、外来性DNA導入細胞を分化・成熟させることができる点で好ましい。

【0018】

本発明の外来性DNAの発現産物に対する後天的免疫寛容は、例えば、上記方法により得られた幼若Tリンパ球に前記外来遺伝子等の目的遺伝子が組み込まれたベクターを導入し、かかるベクターが導入された幼若Tリンパ球を、胸腺への直接注射や、経静脈注射することにより胸腺に移入させ、胸腺器官内でかかる外来性DNAを発現させることにより獲得することができる。その際、外来性DNAにより惹起される免疫応答も同時に回避することができる。

【0019】

本発明における遺伝子治療効果の持続方法は、遺伝子治療における外来性DNAを幼若Tリンパ球を介して胸腺へ導入することを特徴とし、特に遺伝子治療における外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で外来性DNAを発現させることにより、外来性DNA及び／又はその発現産物により惹起される免疫応答を例えば1ヶ月以上の長期間にわたり回避することを特徴とするものであり、遺伝子治療効果の持続は、前記外来性DNA及び／又は

その発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法における外来性DNAとして、遺伝子治療に有用な外来性DNAを用いる場合に達成することができる。

【0020】

本発明における外来性DNA及び／又はその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物は、幼若Tリンパ球を介して胸腺へ外来性DNAを導入することを特徴とし、特に外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させることを特徴とする。かかる非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウサギ等の哺乳動物を例示することができるが、育成、使用の簡便さ等からしてマウスが好ましい。以下、本発明を、非ヒト動物がマウスの場合を例にとった実施例を挙げて更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0021】

【実施例】

実施例1（培養液の調製）

RPMI 1640 [最終濃度で、50 μ Mの2-メルカプトエタノール（シグマケミカル社製）、10 mMのヘベス（Gibco BRL社製）、2 mMのL-グルタミン（Gibco BRL社製）、1 \times 非必須アミノ酸（Gibco BRL社製）、1 mMのピルビン酸ナトリウム（Gibco BRL社製）、100 U/mlのペニシリン（Gibco BRL社製）、100 μ g/mlのストレプトマイシン（Gibco BRL社製）を含む培地]に、56℃で30分間前処理をした10%のウシ胎児血清（FCS）を添加した培養液（10% FCS-RPMI 1640培地）を調製した。なお、実施例における操作はすべてクリーンフード内で無菌的に行った。

【0022】

実施例2（マウス胎仔胸腺葉の採取）

妊娠日齢15～16日目のマウスを頸部切断により殺し、70%のエタノールでマウスの腹部を清拭した後、胎仔を子宮ごと100 mm無菌皿に取り出した。この子宮から胎仔を取り出して、実施例1の培地20～30 mlの入った100 mm無菌皿に胎仔を移し、2～3回静かに皿を回転させ洗浄して血液とその余の

夾雑物を取り除いた。かかるマウス胎仔を顕微鏡下に置き、静かに胸部を切開して2つの胸腺葉を取り出し、ガーゼの上に置き血液を取り除き、マウス胎仔胸腺葉を採取した。

【0023】

実施例3（培養ウェルの調製）

殺菌したヘリスタット (Helistat) スポンジ (Colla-Tec, Inc., Plainsboro, NJ 08536) の小片を24ウェルプレート（直径16mm、無菌）の培養ウェルに置き、実施例1の培地1mlを入れ、スポンジのなめらかな面を上に向け、無菌ポリカーボネートフィルター膜 (Costar, Nucleopore Corp. PC membrane, #110409, 直径113mm) をその上に置き、フィルター膜を鉗子で裏返して、フィルター膜の両面を培地で完全に浸した後、そこから0.5mlの培地をウェルから静かに抜き取り、最終の培地を1ウェル当たり0.5mlに調製した。

【0024】

実施例4（マウス胸腺葉の組織培養）

実施例2で得られた4～6葉の胸腺葉を、実施例3で調製した培養ウェルのスポンジ上のフィルター膜に載置し、胸腺葉が培地液に浸漬しない状態で、CO₂ インキュベーター中にて培養した。

【0025】

実施例5（胎仔胸腺組織培養後の単細胞浮遊液の調製）

30mm皿の蓋裏側の中心に、100 μ lの染色緩衝液 [0.2%のウシ血清アルブミン (BSA) と0.1%のNaN₃を含むpH7.2のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)] を滴下し、その中に実施例4で組織培養した胸腺葉を移し、7型鉗子を用いて胸腺葉の数をカウントした。次に小さいナイロンメッシュ（およそ5mm²）を胸腺葉が移された緩衝液の上に載せ、針先の曲がった26ゲージ針（先端から5mm、90度の角度）と1mlシリンジを用いて、これらをナイロンメッシュに押しつけながら胸腺葉をそっと裂き、得られた単細胞浮遊液をシリンジ内のプラスチックチューブに移し、細胞の数をカウントして所定濃度の細胞懸濁液を調製した。

【0026】

実施例 6 (ウイルスプロデューサー細胞の作製)

GFP遺伝子から調製したS65T変異体をコードする740bpのDNA(クローンテック社製)をpGD'のBclIサイト(図1a)又はpMSCVのHpaIサイト(図1b)にクローニングした。このクローニングにより得られた組み換えベクターをGP+E-86細胞にトランスフェクションした。G418耐性細胞の中から、FACSバンテージセルソーター(Becton Dickinson社製)を用いてGFP^{high}クローンを分離した。分離されたクローンから得られた濾過上清の希釈液とNIH-3T3(ATCC CRL-1658)のG418耐性細胞とをいっしょに1日間培養し、ウイルスの力価を測定し、 10^6 CFU/ml以上の力価を有するウイルスプロデューサー細胞(組み換えベクターをインフェクションしたGP+E-86細胞)を以下の実施例に用いた。

【0027】

実施例 7 (ウイルス感染幼若Tリンパ球の作製)

上記実施例5によって得られた単細胞の幼若Tリンパ球浮遊液を最終的に $0.5 \sim 2 \times 10^4$ 個/ウェルとなるように96フラットウェルに分注し、さらにあらかじめトリプシン処理し、1日間培養した上記ウイルスプロデューサー細胞を1ウェルあたりに $2 \sim 5 \times 10^3$ 個加えて、これらをウェル内で混合した。この混合物を、最終濃度 $1 \sim 5$ ng/mlのマウスの組換えIL-7(インターロイキン7; Genzyme社製)、又はこれと最終濃度 $1 \sim 5$ ng/mlの幹細胞因子(SCF)の存在下において1~2日間培養した。その後、共培養した幼若Tリンパ球を静かにピペッティングしながら回収した。幼若Tリンパ球はプロデューサー細胞よりも小さく、密集度が低いことを利用して、遺伝子が導入された幼若Tリンパ球(図2のa部分)をフォーワード&サイドスキャッター(forward and side scatter)により分離(図2)、蛍光活性化セルソーターにより、生存能力のある幼若Tリンパ球を分離・精製した。

また、造血細胞マーカーCD45に対する抗体を染色したものを使用して、フローサイトメトリーセルソーターでGFP⁺CD45⁺細胞をソートすることにより、遺伝子が導入された幼若Tリンパ球を、繊維芽細胞由来のウイルスプロデューサー細胞から識別して分離・精製した。

【0028】

実施例 8 (遺伝子導入幼若 T リンパ球による導入遺伝子の発現)

正常なマウス (B 6) の T リンパ球を一過性に抑制するために低線量の放射線を照射し、上記実施例 7 により得られた遺伝子導入幼若 T リンパ球を胸腺へ直接注射することにより胸腺に移入した。このマウスの放射線照射からの回復を待ってから、pGD-GFP レトロウイルスを導入した脾細胞を腹腔内に注射し、2 週間後、抗 GFP 抗体を酵素抗体法を用いて血中抗体価で測定した。また、コントロールとして抗 BSA (仔牛血清アルブミン) 抗体をも同様に測定した。結果を図 3 に示す。図 3 中、“No treatment” は無処理の正常なマウス (B 6) における血中抗体価を意味し、当然のことながら抗体が生成しないことがわかる。

“pGD-GFP ip” は、正常なマウス (B 6) に pGD-GFP レトロウイルス導入脾細胞を腹腔内に注射したときの血中抗体価を意味し、GFP の発現により抗 GFP 抗体が生成していることが示されている。“pGD-GFP it” は、pGD-GFP レトロウイルス導入脾細胞を腹腔内に注射していない上記実施例 7 により得られた遺伝子導入幼若 T リンパ球胸腺移入マウス (B 6) の血中抗体価を意味し、このマウスでは抗 GFP 抗体が殆ど生成しないことがわかる。“pGD-GFP it → pGD-GFP ip” は、上記実施例 7 により得られた遺伝子導入幼若 T リンパ球胸腺移入マウス (B 6) に、pGD-GFP レトロウイルス導入脾細胞を腹腔内に注射したときの血中抗体価を意味し、このマウスにおいて抗 GFP 抗体が殆ど出現していないことがわかる。以上の結果から、上記実施例 7 により得られた遺伝子導入幼若 T リンパ球胸腺移入マウス (B 6) において、ウイルスベクター由来の GFP 成分に免疫寛容が成立したことを確認した。すなわち、抗ベクター免疫応答を回避させることができ、持続的な遺伝子治療が可能となることがわかった。またこのとき、ベクター成分以外の外来分子に対する免疫応答は正常に保たれており、マウスの免疫系全体が傷害を受けたわけではなく、遺伝子治療用のベクターに対しての特異的免疫寛容が誘導されたことも確認した。

【0029】

【発明の効果】

本発明によると、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性 DNA が導入

された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で上記外来性DNAを発現させることにより当該外来性DNAやその発現産物に対して後天的免疫寛容を獲得させることができ、また、かかる外来性DNAやその発現産物に対する拒絶応答を回避させ、遺伝子治療の効果を長期間安定して持続して行うこともできる。さらに、本発明の外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物は、遺伝子治療等の研究開発に用いると極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明における遺伝子導入に用いたベクターの構成を示す図である。

【図2】

フォーワード&サイドスキャッターによる遺伝子導入幼若Tリンパ球とウイルスプロデューサー細胞の分析結果を示す図である。

【図3】

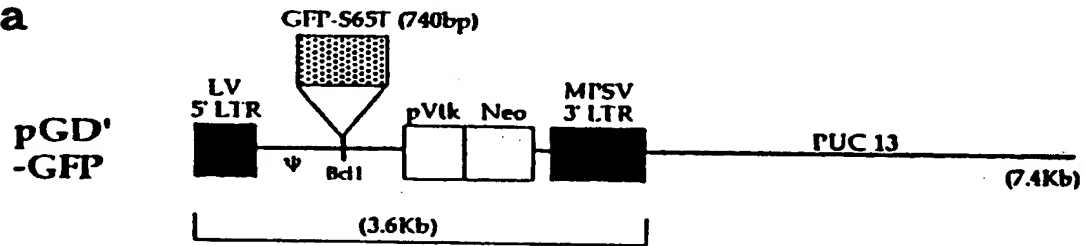
遺伝子導入幼若Tリンパ球胸腺移入マウスにおける免疫応答の結果を示す図である。

【書類名】

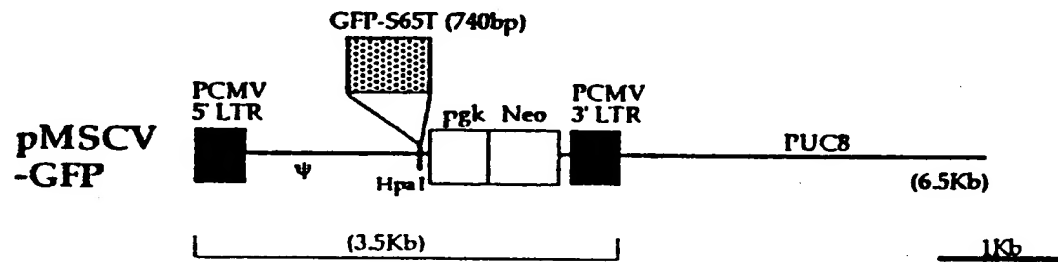
図面

【図 1】

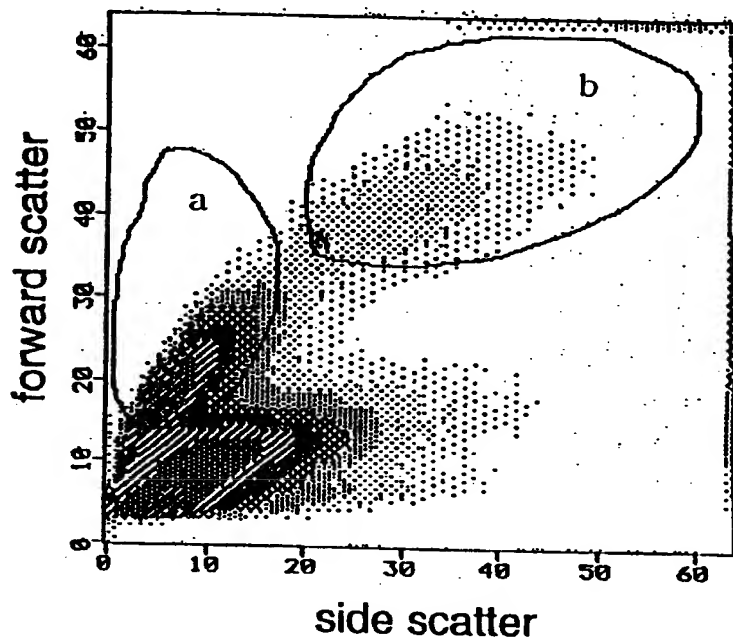
a



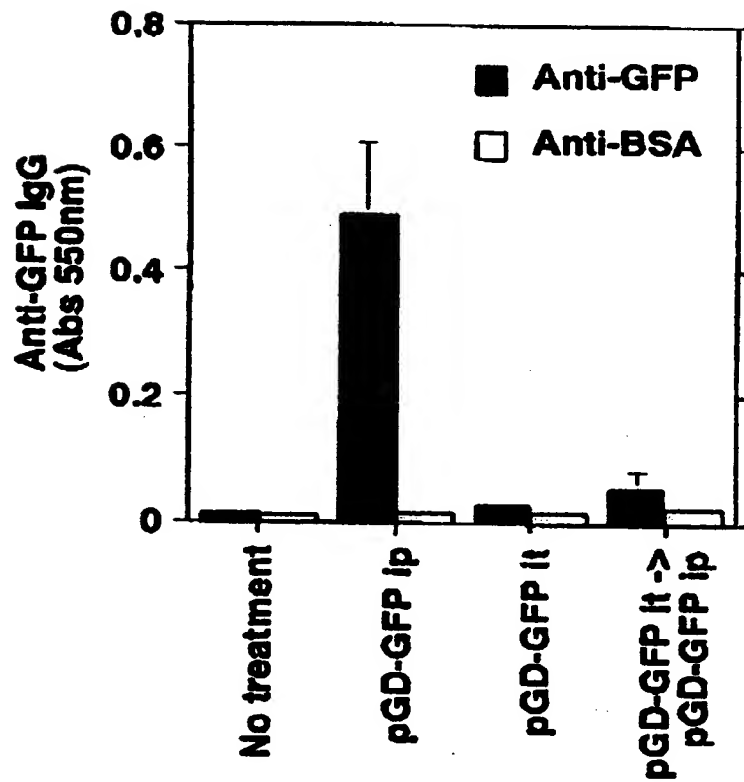
b



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物を「非自己」ではなく「自己」として認識させることができる、外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容の獲得方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する拒絶応答を回避することができる遺伝子治療効果の持続方法や、外来遺伝子が組み込まれたベクター等の外来性DNAやその発現産物に対する後天的免疫寛容を獲得した非ヒト動物を提供すること。

【解決手段】 外来遺伝子が組み込まれたウイルスベクター等の外来性DNAが導入された幼若Tリンパ球を胸腺に移入して、胸腺器官内で前記外来性DNAを発現させる。上記外来性DNAを幼若Tリンパ球に導入する方法としては、例えば、幼若Tリンパ球とウイルスベクター感染ウイルスプロデューサー細胞とを共培養する方法を挙げることができる。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

